

УДК 578.833.28:578.427(571.1)

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ АГЕНТОВ,
ПЕРЕНОСИМЫХ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ
В г. ТОМСКЕ И ЕГО ПРИГОРОДАХ**

© Е. В. Чаусов,¹ В. А. Терновой,¹ Е. В. Протопопова,¹ С. Н. Коновалова,¹
Ю. В. Кононова,¹ Н. Л. Першикова,¹ Н. С. Москвитина,²
В. Н. Романенко,² Н. В. Иванова,² Н. П. Большакова,²
С. С. Москвитин,² И. Г. Коробицын,² С. И. Гашков,²
О. Ю. Тютеньков,² В. Н. Куранова,² Л. Б. Кравченко,²
Н. Г. Сучкова,² Л. П. Агулова,² В. Б. Локтев¹

¹ Отдел молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов,
ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Кольцово, Новосибирская обл., 630559

² Томский государственный университет,
кафедра зоологии позвоночных и экологии
пр. Ленина, 36, Томск, 634050

E-mail: zoo_tsu@mail.ru; ¹ loktev@vector.nsc.ru

Поступила 14.05.2009

У иксодовых клещей, собранных в городских и пригородных биотопах г. Томска, обнаружены РНК или ДНК следующих инфекционных агентов: вирусов клещевого энцефалита (ВКЭ) и Западного Нила (ВЗН), *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. Уровень смешанных инфекций достигал 5.7%. Генотипирование ВКЭ выявило циркуляцию дальневосточного и сибирского генотипа ВКЭ, причем в пригородных очагах доминировал сибирский генотип ВКЭ, а в городских биотопах доля дальневосточного генотипа существенно возрастала. Вирус Западного Нила был представлен генотипом Ia. Филогенетический анализ *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp. и *Rickettsia* spp. показал, что они представлены соответственно *B. garinii*, *E. muris*, *R. tarasevichiae* и предположительно новым подвидом *R. raoultii*.

Иксодовые клещи являются переносчиками многих инфекционных заболеваний вирусной, бактериальной и паразитарной природы. В их число входят клещевой энцефалит (КЭ), энцефалит Повассан, лихорадка Западного Нила (ЛЗН), иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), клещевой риккетсиоз, бабезиоз, эрлихиоз и бартонеллез (Aleksseev et al., 2004). Клинические проявления этих инфекционных заболеваний особенно на начальной стадии могут быть весьма сходными и в ряде случаев могут ошибочно трактоваться как КЭ (Коренберг, 2002; Korenberg, Likhacheva, 2006).

Наиболее патогенным для человека является вирус клещевого энцефалита, представитель рода *Flavivirus*, широко распространенный в Европе и Азии. На эндемичных по ВКЭ территориях проживает примерно 700 млн

человек, исключая Китай. Заболевание, вызванное ВКЭ, фиксируется в более чем 30 странах Европы и Азии (Suss, 2003). Ежегодная заболеваемость КЭ в мире составляет до 14 000 случаев, из них примерно до 11 000 — в России (Gritsun et al., 2003a). Систематических данных по заболеваемости в Китае нет, известно лишь, что в 1994 г. зарегистрировано 3500 случаев КЭ (Suss, 2003).

Другой представитель рода *Flavivirus* — вирус Повассан (ВП). Он входит в комплекс ВКЭ и вызывает у человека энцефалит. Встречается на территории Северной Америки и Дальнего Востока России (Леонова и др., 1980; Tsai, 1991). Еще один представитель того же рода, вирус Западного Нила (ВЗН), является возбудителем одноименной лихорадки. ВЗН выявлен в Африке, Австралии, Южной и Северной Америке, Евразии, в том числе и в РФ (Lancioti et al., 2002; Guthrie et al., 2003; Mackenzie et al., 2003; Терновой и др., 2004, 2006; Кононова и др., 2006; Morales et al., 2006). ВЗН в основном передается комарами, хотя доказано, что иксодовые клещи тоже способны играть роль в его передаче (Anderson et al., 2003; Москвитина и др., 2008).

Иксодовый клещевой боррелиоз (болезнь Лайма, ИКБ) вызывается бактериями рода *Borrelia*, геновидов *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. spielmanii* (Smith et al., 2006; Majlathova et al., 2006). Среди переносимых иксодовыми клещами инфекций ИКБ занимает второе место после КЭ по показателям заболеваемости в РФ. Ежегодно в стране регистрируется 6—8.5 тыс. случаев ИКБ (Kogenberg, Likhacheva, 2006).

Клещевой риккетсиоз (клещевой сыпной тиф, сибирский сыпной тиф, северо-азиатский риккетсиоз) — инфекционное заболевание человека, вызываемое микроорганизмами рода *Rickettsia*, передающиеся иксодовыми клещами. Заболевания человека связывают с *R. sibirica*, *R. mongolotimonae* и *R. heilongjiangensis*, патогенность *R. raoultii* и *R. tarasevichae* для человека еще точно не установлена (Mediannikov et al., 2004; Shpynov et al., 2004; Shpynov et al., 2006). Клещевые риккетсиозы широко распространены в Западной, Центральной и Восточной Сибири, Хабаровском и Приморском краях, некоторых районах Восточного и Северного Казахстана, в Армении, Туркмении и Монголии.

Эрлихиозы человека и животных — природно-очаговые инфекции, переносимые иксодовыми клещами и вызываемые бактериями рода *Ehrlichia*. С заболеваниями человека и животных связывают *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* и *E. canis*. Возбудители выявлены у иксодовых клещей, животных и людей во многих странах, что свидетельствует о широком распространении эрлихиозов, в том числе и в Российской Федерации (Shpynov et al., 2004; Tabara et al., 2007).

Клещевой бабезиоз человека и животных вызывается простейшими рода *Babesia*, паразитирующими в эритроцитах млекопитающих. С заболеваниями человека и животных связывают *B. divergens* и *B. microti*. Различные виды бабезий распространены на значительном географическом пространстве, включая Северную Америку, Европу, Африку и Юго-Восточную Азию (van Reenen et al., 1977; Karbowiak et al., 1999; Burkot et al., 2000). Среди бактерий рода *Bartonella* патогенными для человека являются 9 видов, из которых в качестве переносимых клещами патогенов идентифицированы *B. henselae* (возбудитель болезни кошачьих царапин) и *B. quintana* (возбудитель окопной лихорадки). Данные патогены широко распространены во всем мире (Chang et al., 2002; Morozova et al., 2004; Kim et al., 2005).

Совместная циркуляция разнообразных клещевых инфекций во многих природных очагах (Европа и европейская часть России, Урал, Сибирь, Дальний Восток, Казахстан, Япония) и возможность совместного инфицирова-

ния ими человека достаточно хорошо документирована (Alekseev et al., 2004; Shpynov et al., 2004; Zamoto et al., 2004; Hilpertshauser et al., 2006; Majlathova et al., 2006; Shpynov et al., 2006; Tabara et al., 2007).

В настоящее время уровень заболеваемости клещевыми инфекциями в Томской обл. является одним из самых высоких в РФ. Он приблизительно в 10 раз превышает средний уровень заболеваемости в России (Онищенко и др., 2007). Это определяет важность и актуальность сведений о спектре клещевых инфекций в г. Томске и Томской обл., уровне зараженности данными инфекциями клещей. Поэтому с целью изучения генетического разнообразия бактериальных и вирусных инфекций, передающихся иксодовыми клещами, мы провели исследование взрослых особей, личинок и нимф, собранных на флаг и снятых с мелких млекопитающих, птиц и ящериц в биотопах г. Томска и его пригородов, на наличие РНК ВКЭ, ВЗН, ВП, ДНК *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp. и *Bartonella* spp. с последующим генотипированием выявленных вариантов этих возбудителей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Отлов клещей проводили методами сбора на флаг (Временные..., 1959) и с прокормителей — мелких млекопитающих, связанных с наземным ярусом птиц и ящериц. Периодичность сборов на флаг для оценки численности клещей составляла от 7 до 10 дней. Сбор на флаг проводили во второй половине дня, когда наблюдается максимальная активность иксодид. При сборе клещей с прокормителей каждое добытое животное помещали в отдельный мешочек из светлой ткани, который затем осматривали на наличие эктопаразитов. У самих животных осматривали также наиболее вероятные места присасывания клещей. Собранных на флаг или с прокормителей клещей классифицировали по видам и помещали в отдельные пластиковые микропробирки с кусочками влажной марли на дне для предотвращения гибели от высыхания. Клещей, помещенных в пробирки, хранили в холодильнике при +4 °С.

Обследованные биотопы. Сбор клещей производился в городских и пригородных биотопах г. Томска, описанных ранее (Москвитина и др., 2008).

Выделение суммарных РНК и ДНК. Клещей гомогенизировали в 3М растворе ацетата натрия (рН = 5.2). Суммарную ДНК/РНК выделяли с помощью наборов РИБОСорб (Амплисенс, Россия) и «набора для выделения ДНК/РНК» (НПФ Литех, Россия) согласно инструкциям производителей.

Синтез кДНК проводили с использованием набора РЕВЕРТА-L (Амплисенс, Россия) согласно инструкции производителя.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). На основании сравнения нуклеотидных последовательностей различных штаммов ВКЭ, ВЗН, ВП, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp. и *Bartonella* spp., депонированных в международной базе данных GenBank, нами были рассчитаны и синтезированы олигонуклеотидные праймеры для выявления РНК и ДНК вышеназванных возбудителей (табл. 1).

Праймеры были синтезированы в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирск). Параметры ПЦР (Eppendorf Mastercycler Gradient, Германия): 94 °С×10 с, Тм °С×30 с, 72 °С×1 мин (40 циклов), 72 °С×7 мин.

Определение нуклеотидной последовательности выделенных ПЦР-фрагментов проводили на автоматическом секвенаторе «Beckman CEQ2000XL»

Таблица 1
Список олигонуклеотидов, использованных
для выявления генетических маркеров инфекционных агентов
Table 1. Oligonucleotide primers used in the study

Наз- вание	Возбудитель, ген—мишень	Последовательность	Позиция первого нуклеотида
TBE1f	БКЭ, 5'-конец	AGATTTTCTTGCACGTGCRTGCGTTTG	1
TBE2r		CCCAKCATGCGCATCAAC	240
WN1f	ВЗН, белок E	CCTTGGWATGAGCAACAGAGACTTC	951
WN2r		GTGTCAATRCTTCCTTTGCCAAATA	1287
POW1f	ВП, белок NS5	AGGATGCTKGTGAGTGGAGA	9618
POW2r		TACGCYTTGGACAGGCAG	9904
Borr1f	<i>Borrelia</i> spp., ген флагелли-	CATTTGGTTATATTGAGCTT	147 712
Borr2r	на	AATTTTATTCAGACAACAGA	148 045
Rick1f	<i>Rickettsia</i> spp., ген цитрат-	TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGC	1 212 693
Rick2r	синтазы	GCTATTAGAATGATTGCTAAGATAACC	1 213 279
Bab1f	<i>Babesia</i> spp., 18S РНК	GTAGGACTTTGGTTCTATTTTG	784*
Bab2r		GTCAATCCTACCGTTTGTCTGG	1226*
Bart1f	<i>Bartonella</i> spp., ген гемин-	ACTTCTGTTATCGCTTTRRTTTC	306 209
Bart2r	связывающего белка	TCACCACCAGCAACATAAGGCATAAT	306 734
Ehr1f	<i>Ehrlichia</i> spp., ген дисуль-	TTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA	278 329
Ehr1r	фид оксидоредуктазы	GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA	278 706

Примечание. * — Позиция в гене 18S РНК.

(Beckman Coulter, США) с использованием наборов GenomeLab DTCS Kit (Beckman Coulter, Cat# 608000) согласно инструкции производителя. Нуклеотидные последовательности для проведения филогенетического анализа были получены из базы данных GenBank. Обработка последовательностей проводилась с использованием специализированных программных пакетов MEGA 4 (PSU, США) и Vector NTI 8 (InforMax, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На территории исследованных биотопов г. Томска и его пригородов обнаружено 4 вида клещей: *Ixodes persulcatus* Schulze, *Ix. pavlovskyi* Pomerantzev, *Ix. trianguliceps* Birula и *Dermacentor reticulatus* (Fabricius). Кроме названных видов, на окраине города в единичных экземплярах отмечен вид *Haemaphysalis concinna* Koch. Как по данным учетов клещей на флаг, так и по количеству личинок и нимф, собранных с различных животных, в городских биотопах доминирует *Ix. pavlovskyi*, а в пригородных наиболее значительна доля *Ix. persulcatus*.

У *D. reticulatus* обнаружена ДНК *Borrelia* spp. и РНК БКЭ. У *Ix. pavlovskyi* и *Ix. persulcatus* обнаружены маркеры (РНК/ДНК) БКЭ, ВЗН, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. ДНК *Bartonella* spp., *Babesia* spp. и РНК ВП при анализе 220 проб из различных биотопов обнаружены не были, поэтому тестирование на наличие этих патогенов было прекращено. Количество инфицированных клещей колебалось от 0 до 16 % для различных биотопов в различные временные промежутки.

Вирус клещевого энцефалита. Среди 1806 исследованных особей РНК ВКЭ выявлена у 118 (6.5 %). Вирусофорность клещей была неодинакова в разные месяцы эпидсезона. Так, положительными на наличие РНК ВКЭ в 2006 г. в биотопе «Коларово» в мае оказались 3 из 52 клещей всех стадий развития (5.8 %), в июне — 4 из 228 (1.8 %), в июле — 5 из 107 (4.7 %). При этом зараженными в мае—июне оказываются имаго обоих полов, а у появляющихся в июне личинок и нимф ВКЭ практически не обнаруживался. Напротив, в июле основной вклад в уровень зараженности вносят личинки и нимфы.

Аналогичная динамика наблюдалась и для других биотопов в 2006 и 2007 гг. Изменение уровня вирусофорности в зависимости от месяца связано с появлением новых особей иксодовых клещей, поскольку эффективность трансвариальной и трансфазовой передачи вируса далека от 100 % (Чунихин и др., 1983). Таким образом, средняя вирусофорность максимальна в мае у перезимовавших имаго, далее в июне с появлением незараженных особей (личинок и нимф) снижается, а в июле снова возрастает за счет передачи вируса при совместном питании инфицированных и неинфицированных особей на прокормителях.

Для оценки генетического разнообразия была определена нуклеотидная последовательность 5'-нетранслируемой области ВКЭ для 36 положительных проб. Проведенный филогенетический анализ показал (рис. 1), что 10 (27.8 %) из них принадлежат к дальневосточному генотипу ВКЭ, а 26 (72.2 %) — к сибирскому. Варианты ВКЭ сибирского генотипа показали существенное генетическое разнообразие, формируя несколько субгрупп в пределах сибирского генотипа, что свидетельствует о длительном времени эволюции ВКЭ на территории г. Томска и его пригородов. Четыре выявленных варианта ВКЭ группируются вместе со штаммом «Заусаев», формируя отдельную подгруппу. Штамм «Заусаев» был выделен в 1985 г. в Москве от больного с хронической прогрессирующей формой КЭ (Gritsun et al., 2003b). По описанию авторов, больной был укушен клещом в 1973 г. в Томске, после чего заболел хронической формой ВКЭ, приведшей к летальному исходу. Факт обнаружения четырех новых вариантов этой геногруппы ВКЭ в Томске подтверждает данные о происхождении штамма Заусаев из природных очагов ВКЭ в Томске. Принципиально важно отметить, что изоляты ВКЭ, генетически близкие к штамму «Заусаев», по всей вероятности, также способны вызывать хронические формы КЭ у человека. Причем эти варианты были обнаружены и в городском, и в пригородных биотопах. Уровень дивергенции выявленных вариантов и штамма Заусаев сравнительно невысок, что говорит об относительной консервативности внутри данной геногруппы ВКЭ.

В пригородных биотопах сибирский генотип ВКЭ обнаруживался существенно чаще, чем в городских (соответственно 85 и 57.1 % от общего количества выявленных вариантов ВКЭ). Хотя Томская обл. считается областью преимущественного распространения сибирского генотипа ВКЭ (Злобин и др., 2007), нами было обнаружено значительное количество вариантов дальневосточного генотипа. Данный генотип наиболее широко представлен в городских биотопах, хотя встречается и в пригородных (соответственно 42.9 и 15 % от общего количества выявленных вариантов ВКЭ). Такое распределение генотипов позволяет предположить, что сибирский генотип ВКЭ действительно является эндемичным для Томска и области, а дальневосточный сравнительно недавно проник на территорию города, возможно, в результате деятельности человека, а в настоящее время постепенно распространяется и в пригороды. Генетическое разнообразие выявленных вариантов ВКЭ дальневосточного генотипа не так велико, как у сибирского. Они

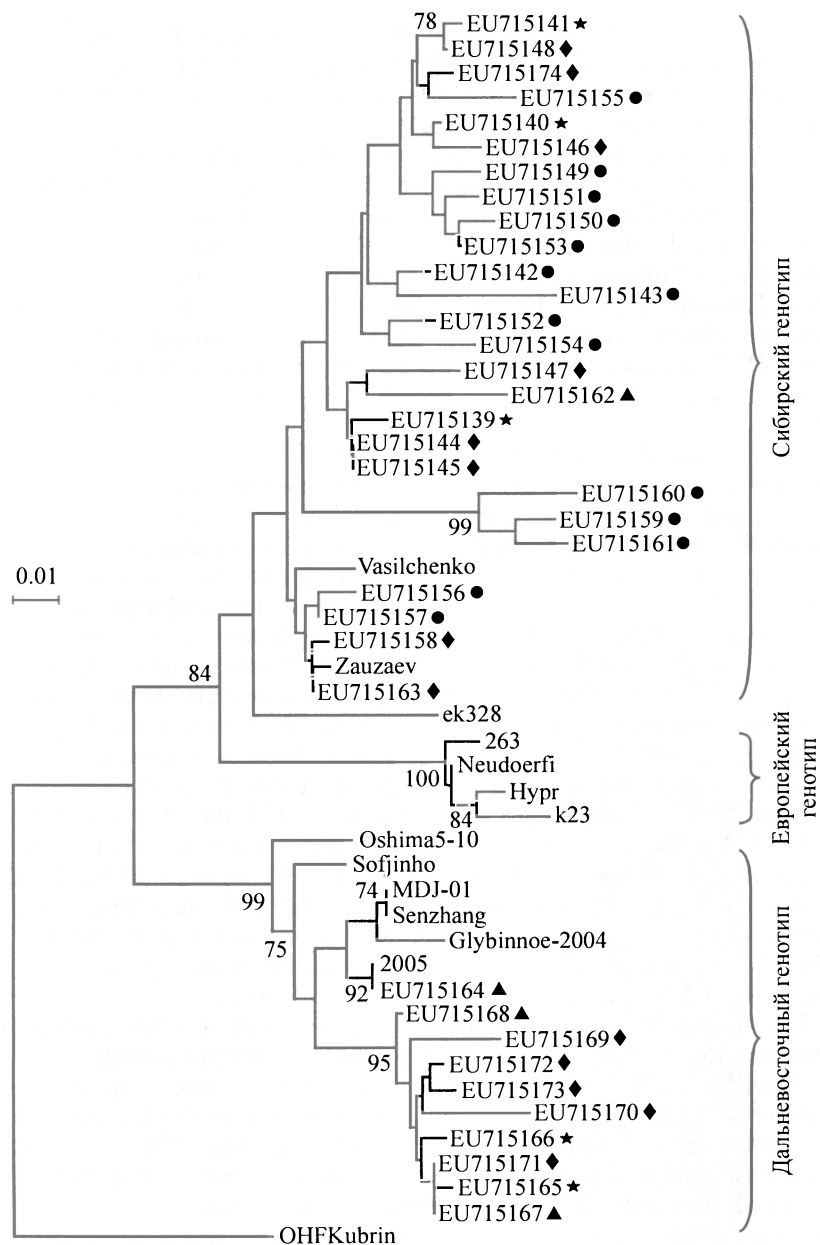


Рис. 1. Филогенетическое дерево выявленных вариантов ВКЭ, построенное на основе нуклеотидных последовательностей 5'-НТО. Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-параметрической модели Кимуры. Линия отражает генетическую дистанцию.

* — биотоп ТНХК, ♦ — Южное кладбище, • — Коларово, ▲ — ТГУ.

Fig. 1. Phylogenetic tree (neighbour-joining, Kimura two-parameter distances), based on 5'UTR sequences of TBEV. Line depicts genetic distance.

формируют только 2 геногруппы, одна из них представлена вариантом, близким к прототипному штамму 205 ВКЭ; другая объединяет все остальные выявленные варианты дальневосточного генотипа, что свидетельствует об общности их эволюции и происхождения.

Вирус Западного Нила. На наличие РНК ВЗН было исследовано 1540 особей, из них положительными оказались 34 (2.2 %). Для двух выявленных вариантов ВЗН определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена белка Е. Филогенетический анализ позволил отнести выявленные варианты к генотипу 1a ВЗН (рис. 2), а именно к штаммам, сходным со штаммом LEIV-Vlg99-27889-human ВЗН. Этот штамм был выделен из мозга пациента, погибшего в 1999 г. в г. Волгограде, и циркуляция подобных штаммов ВЗН была ранее обнаружена в Новосибирской обл. у птиц, мелких грызунов и у людей (Терновой и др., 2004; Кононова и др., 2006; Терновой и др., 2007).

Первые находки РНК ВЗН в 2006 г. у клещей в биотопе «Коларово» зарегистрированы в первой декаде мая (1.9 %), количество инфицированных клещей возрастает в июне (3.5 %) и продолжает расти к июлю (4.7 %). Аналогичная картина наблюдается и в других исследованных биотопах. Это позволяет предположить, что активная передача ВЗН клещами осуществляется в течение всего сезона их активности. Раннее обнаружение инфицированных ВЗН клещей говорит о возможности его сохранения в зимний период. Как было показано выше, на городских и пригородных участках доминируют разные виды клещей. Поскольку уровень их инфицированности ВЗН вполне сопоставим, можно говорить о равнозначности роли *Ix. persulcatus* и *Ix. pavlovskyi* в возможной циркуляции вируса ЛЗН в целом, однако в городских условиях более важная роль в циркуляции ВЗН принадлежит *Ix. pavlovskyi*.

Боррелии. ДНК *Borrelia* spp. обнаружена у 123 из 1540 исследованных особей (8 %). Так же как и у ВКЭ, с мая по июль наблюдаются изменения в уровне зараженности клещей. В мае в биотопе «Коларово» ДНК *Borrelia* spp. определялась у 9.6 % имаго, в июне также у имаго, но не у личинок и нимф (4.8 % от суммарного количества клещей всех стадий развития). В июле ДНК *Borrelia* spp. определялась у 4.7 % личинок и нимф, но не у имаго. В других биотопах наблюдалась аналогичная картина.

Для 5 выявленных вариантов *Borrelia* spp. была определена нуклеотидная последовательность гена флагеллина (номера последовательностей в базе данных GenBank EU919251 — EU919255). Сравнение с нуклеотидными последовательностями *Borrelia* spp. в базе данных GenBank с помощью поисковой системы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) показало 100%-ную гомологию с различными штаммами геновида *B. garinii*. Филогенетический анализ данных нуклеотидных последовательностей также показал, что выделенные варианты *Borrelia* spp. принадлежат к *B. garinii* (рис. 3). Ранее в работе (Стронин и др., 2001) была показана принадлежность единичного изолята боррелии в Томской обл. к *B. garinii*, а согласно данным (Фоменко и др., 2007), в Томской обл. были выявлены *B. garinii* и *B. afzelii*.

Риккетсии. ДНК *Rickettsia* spp. была выявлена у 39 из 1540 исследованных клещей (2.5 %). В биотопе «Коларово» в мае 2006 г. зараженность имаго составила 9.6 %, в июне — 4.8 %, причем ДНК *Rickettsia* spp. выявлялась как у имаго, так и у личинок и нимф, а в июле у 4.7 % личинок и нимф.

Для 8 выявленных вариантов *Rickettsia* spp. была определена нуклеотидная последовательность гена цитратсинтазы (номера последовательностей в базе данных GenBank EU919256 — EU919263). Согласно данным анализа последовательностей в базе данных GenBank с помощью системы BLAST, из

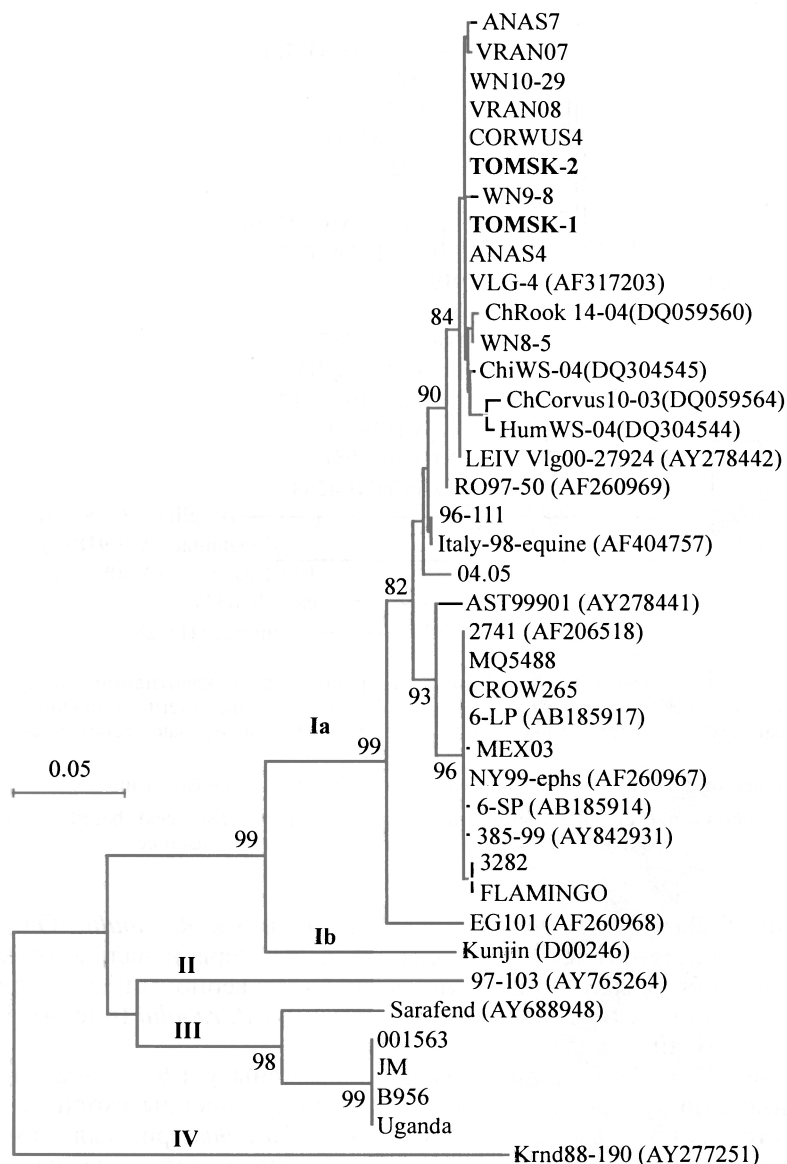


Рис. 2. Филогенетическое дерево ВЗН, построенное по нуклеотидной последовательности фрагмента гена белка Е. Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-параметрической модели Кимуры. Генотипы отражены над ветвями. Линия отражает генетическую дистанцию.

Tomsk-1 и 2 — ВЗН из биотопов «ТХНК», вид *Ix. persulcatus* и «Старое кладбище», вид *Ix. pavlovskyi*; Кулундинская степь, июнь—июль, 2003 г.: Anas4 — чирок-трескунов, Anas7 — чирок-свистунок; Барабинская лесостепь: 2002 г., Corvus4, Vran07 и 08 — грачи; Vlg-27924 — штамм LEIV Vlg00 27924 ВЗН; Северо-Западная Монголия, 2003 г.: WN9-8 — клушица; WN10-29 и WN8-5 — большой баклан; Новосибирская обл., 2004 г.: ChRook14-04, ChiWS-04, ChCorvus10-03, HumWS-04 — птицы и человек.

Fig. 2. Phylogenetic tree (neighbour-joining, Kimura two-parameter distances), based on protein E sequences of WNV. Line depict genetic distance.

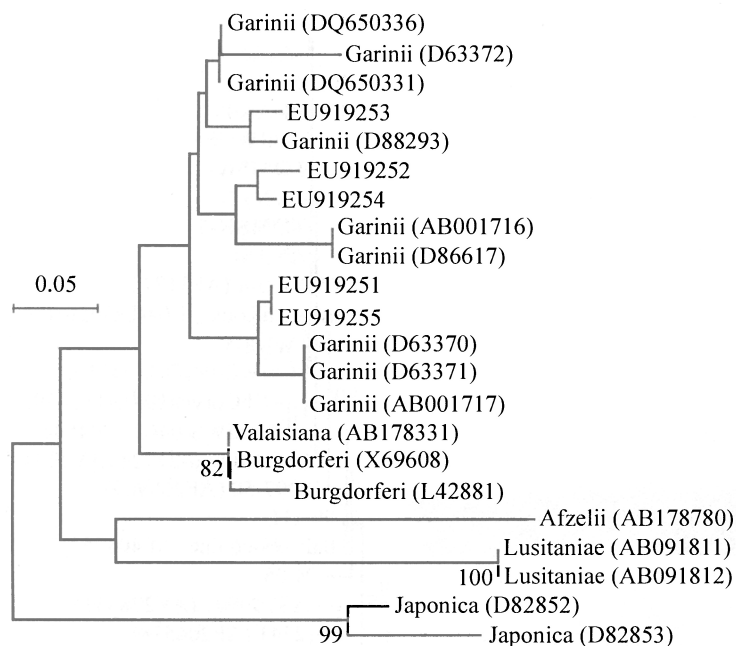


Рис. 3. Филогенетическое дерево *Borrelia* spp., построенное по нуклеотидной последовательности фрагмента гена флагеллина. Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-параметрической модели Кимуры. Линия отражает генетическую дистанцию.

Для прототипных последовательностей указан подвид и номер в базе данных GenBank.

Fig. 3. Phylogenetic tree (neighbour-joining, Kimura two-parameter distances), based on flagellin gene sequences of *Borrelia* spp. Line depict genetic distance.

8 вариантов 5 были отнесены к *R. tarasevichiae* и 3 к *R. raoultii*. Однако при построении филогенетического дерева варианты, первоначально отнесенные к *R. raoultii*, образовали отдельную ветвь, достоверно (индекс поддержки ветвей = 99) отличную от прототипных штаммов *R. raoultii* (рис. 4). Возможно, данные варианты являются новым подвидом.

Эрлихии. ДНК *Ehrlichia* spp. были обнаружены у 1.67 % исследованных особей, инфицированность которых в различные месяцы сходна с таковой для риккетсий. Для 3 выявленных вариантов *Ehrlichia* spp. была определена нуклеотидная последовательность гена дисульфид оксидоредуктазы (номера последовательностей в базе данных GenBank EU919248 — EU919250). При филогенетическом анализе все выявленные варианты были отнесены к *E. muris* (рис. 5).

Смешанные инфекции. Смешанные инфекции встречались достаточно часто. Так, из 1540 проанализированных проб в 88 пробах было обнаружено наличие двух и более патогенов (табл. 2). Фактически не были обнаружены только варианты, в которых были бы диагностированы 4 патогена и/или вариант ВЗН + ВКЭ + риккетсия. Особенно часто в качестве дополнительного патогена встречаются боррелии. Они были обнаружены в 63 пробах со смешанными инфекциями. Клещевые риккетсиозы встречаются реже, всего в 18 пробах. Микст-инфицирование было более характерно для имаго, в то время как личинки и нимфы, за единичным исключением, инфицированы каким-либо одним патогеном.



Рис. 4. Филогенетическое дерево *Rickettsia* spp., построенное по нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитратсинтазы. Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-параметрической модели Кимуры. Линия отражает генетическую дистанцию.

Для прототипных последовательностей указан подвид и номер в базе данных GenBank. Жирным шрифтом выделены последовательности, полученные в работе.

Fig. 4. Phylogenetic tree (neighbour-joining, Kimura two-parameter distances), based on citrate synthase sequences of *Rickettsia* spp. Line depict genetic distance.

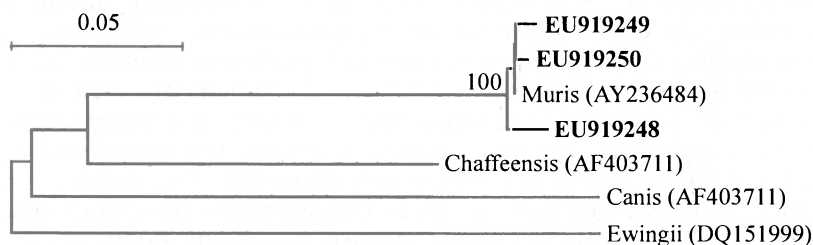


Рис. 5. Филогенетическое дерево *Ehrlichia* spp., построенное по нуклеотидной последовательности фрагмента гена дисульфид оксидоредуктазы. Анализ проведен методом «объединения ближайших соседей» с использованием 2-параметрической модели Кимуры. Линия отражает генетическую дистанцию.

Для прототипных последовательностей указан подвид и номер в базе данных GenBank. Жирным шрифтом выделены последовательности, полученные в работе.

Fig. 5. Phylogenetic tree (neighbour-joining, Kimura two-parameter distances), based on disulfide oxidoreductase sequences of *Ehrlichia* spp. Line depict genetic distance.

Таблица 2
Сочетанные инфекции в проанализированных пробах
Table 2. Mixed infections in examined samples

Сочетания маркеров инфекционных агентов	Количество положительных образцов (на 1540 проанализированных проб)	Частота встречаемости сочетанной инфекции (процент от общего числа проб)
ВКЭ + ВЗН	17	1.10
ВКЭ + риккетсия	3	0.19
ВЗН + риккетсия	5	0.32
ВКЭ + боррелия	23	1.49
ВЗН + боррелия	14	0.90
Боррелия + риккетсия	5	0.32
ВКЭ + ВЗН + боррелия	16	1.03
ВКЭ + боррелия + риккетсия	4	0.26
ВЗН + боррелия + риккетсия	1	0.06
Всего	88	5.71

ОБСУЖДЕНИЕ

В клещах, собранных в двух городских и двух пригородных биотопах г. Томска в течение 2006—2007 гг., были обнаружены маркеры 5 инфекционных агентов: вирусов клещевого энцефалита и Западного Нила, *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. Уровень инфицированности клещей сильно колебался в зависимости от времени и места сбора клещей. Наиболее часто в клещах обнаруживалась РНК ВКЭ и ВЗН, а также ДНК боррелий, уровень инфицированности колебался от 0 до 16 %. Уровень смешанных инфекций достигал 5.7 %, причем самой распространенной микстинфекцией было сочетание ВКЭ и *Borrelia* spp. В 33 пробах было обнаружено одновременное присутствие РНК ВКЭ и ВЗН.

В пригородных очагах доминировал сибирский генотип ВКЭ, в городских биотопах — дальневосточный. Сибирский генотип кластеризовался в 7 субклайдов, что свидетельствует о генетическом разнообразии именно сибирского генотипа ВКЭ. Шесть геногрупп были оригинальными и их не удалось соотнести с уже известными геновариантами сибирского субтипа ВКЭ. Это говорит о том, что эти варианты характерны именно для Томских биотопов ВКЭ. Их разнообразие позволяет предположить, что они эволюционировали достаточно длительный период времени в исследованных городских и пригородных биотопах. Важно отметить, что генетическое разнообразие ВКЭ наблюдалось и в городских биотопах. Это свидетельствует в пользу того, что ВКЭ достаточно давно сформировал городские очаги этой инфекции, и они могут представлять значительную опасность для городского населения. Следует особо отметить, что обнаружена циркуляция 4 штаммов, генетически схожих со штаммом Заусаев, который способен вызывать хронические формы КЭ. История этого штамма ВКЭ уходит в 1973 год, когда пациент был предположительно инфицирован именно этим штаммом вируса. Таким образом, геноразнообразие этой группы вирусов сформировалось, как минимум, в течение последних трех десятков лет, и ВКЭ успешно эволюционировал как в городских, так и в пригородных биотопах.

Дальневосточный генотип ВКЭ был более однороден и преимущественно связан с городскими биотопами. Это позволяет высказать предположение о том, что этот генотип появился в биотопах г. Томска относительно недавно и его появление может быть связано с активной экономической деятельностью человека: с перемещением грузов, товаров, транспорта, миграцией населения. Все подобное может привести к перемещению мелких грызунов и паразитирующих на них клещей на значительные расстояния. Особенно значительно число людей, приезжающих в Томск на учебу из Восточной Сибири (Бурятии, Красноярского края и др.), где, как известно, отмечена циркуляция всех трех генотипов ВКЭ, в том числе и дальневосточного (Верхолина и др., 2007). Нельзя исключить и природные факторы. Так, птицы могут участвовать в переносе клещей и соответствующих генотипов ВКЭ, поскольку ряд перелетных видов (большая горлица, глухая кукушка, лесной дупель, синий соловей, соловей-свистун, таежный сверчок, бурая и зеленая пеночки и др.) осуществляют весенние миграции из юго-восточных регионов России и сопредельных стран.

Генетическое разнообразие вируса Западного Нила было минимальным и ограниченным генотипом Ia, схожим с Волгоградскими штаммами ВЗН. Этот генотип ВЗН характеризуется способностью вызывать тяжелые заболевания человека. Обнаружение маркеров ВЗН в клещах в течение 2006—2007 гг. позволяет предположить, что ВЗН эндемичен для этого географического региона и сформировал стойкие природные очаги в городских и пригородных биотопах г. Томска.

Проведено генотипирование возбудителей болезни Лайма и клещевого риккетсиоза. Боррелии в изученных биотопах представлены *B. garinii*, причем они оказались генетически неоднородными и распадались на 3 различных субклайда. Это может быть свидетельством достаточно протяженной микроэволюции данного возбудителя в исследованных природных очагах г. Томска и его пригородах.

Аналогичная картина также наблюдалась для *Rickettsia* spp. Для этого инфекционного агента были выделены генетически разнородные изоляты, относящиеся к *R. tarasevichiae* и *R. raoultii*. Анализ филогенетического дерева показал, что Томские варианты *R. raoultii* кластеризуются в отдельную геногруппу, которая, возможно, является новым подвидом. Анализ нуклеотидной последовательности ДНК *Ehrlichia* spp. позволил все выявленные изоляты отнести к *E. muris*. Нам не удалось обнаружить генетические маркеры вируса Повассан, *Bartonella* spp. и *Babesia* spp. Так как на эти инфекционные агенты было исследовано более 200 проб, можно сказать, что уровень их возможного присутствия в биотопах Томска и его пригородов не превышает частоты 1:220.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования поддержаны грантом РНП.2.1.1.7515 ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы», грантом президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-387.2008.4, Координационным научным советом по санитарно-эпидемиологической охране территории РФ, тема № 17-1-06, номер госрегистрации 01.2.006 08416.

Список литературы

- Временные методические указания по изучению природных очагов клещевого энцефалита и оценке эффективности противоэнцефалитных мероприятий. 1959. Министерство здравоохранения РСФСР. М. 43 с.
- Злобин В. И., Верхозина М. М., Демина Т. В., Джигоев Ю. П., Адельшин Р. В., Козлова И. В., Беликов С. И., Хаснатинов М. А., Данчинова Г. А., Исаева Е. И., Гришечкин А. Е. 2007. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. Вопросы вирусологии. 52 (6) : 4—13.
- Кононова Ю. В., Терновой В. А., Щелканов М. Ю., Протопопова Е. В., Золотых С. И., Юрлов А. К., Друзяка А. В., Славский А. А., Шестопалов А. М., Львов Д. К., Локтев В. Б. 2006. Генотипирование вируса Западного Нила в популяциях диких птиц наземного и древесно-кустарникового комплексов на территориях Барабинской лесостепи и Кулундинской степи (2003—2004 гг.). Вопросы вирусологии. 51 (4) : 19—23.
- Коренберг Э. И., Горелова Н. Б., Ковалевский Ю. В. 2002. Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов в России. Паразитология. 36 (3) : 177—191.
- Коренберг Э. И. 2002. Микст инфекции, передающиеся иксодовыми клещами: актуальные аспекты изучения и профилактики. В кн.: Клещевой энцефалит / Под ред. Г. Н. Леоновой, Л. М. Сомовой-Исачковой. Владивосток.
- Леонова Г. Н., Исачкова Л. М., Баранов Н. И., Кругляк С. П. 1980. Изучение роли вируса Повассан в этиологической структуре клещевого энцефалита в Приморском крае. Вопросы вирусологии. 2 : 173—176.
- Москвитина Н. С., Романенко В. Н., Терновой В. А., Иванова Н. В., Протопопова Е. В., Кравченко Л. Б., Кононова Ю. В., Куранова В. Н., Чаусов Е. В., Москвитин С. С., Першикова Н. Л., Гашков С. И., Коновалова С. Н., Большакова Н. П., Локтев В. Б. 2008. Выявление вируса Западного Нила и его генотипирование в иксодовых клещах (Parasitiformes: Ixodidae) в Томске и его пригородах. Паразитология. 42 (3) : 210—225.
- Онищенко Г. Г., Федоров Ю. М., Пакскина Н. Д. 2007. Организация надзора за клещевым энцефалитом и меры по его профилактике в Российской Федерации. Вопросы вирусологии. 52 (5) : 8—10.
- Стронин О. В., Шутова Н. А., Петров Е. Ю., Хаснатинов М. А., Беликов С. И., Куликов В. Н., Андрейчук Ю. В. 2001. Изоляция и типирование возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов на территории Томской обл. Матер. Всерос. науч. конф. «Клинические перспективы в инфектологии». СПб.
- Терновой В. А., Щелканов М. Ю., Шестопалов А. М., Аристова В. А., Протопопова Е. В., Громашевский В. Л., Друзяка А. В., Славский А. А., Золотых С. И., Локтев В. Б., Львов Д. К. 2004. Выявление вируса Западного Нила у птиц на территории Барабинской и Кулундинской низменностей (Западно-Сибирский перелетный путь) в летне-осенний период 2002 г. Вопросы вирусологии. 49 (3) : 52—56.
- Терновой В. А., Протопопова Е. В., Сурмач С. Г., Газетдинов М. В., Золотых С. И., Шестопалов А. М., Павленко Е. В., Леонова Г. Н., Локтев В. Б. 2006. Генотипирование вируса Западного Нила, выявленного у птиц на юге Приморского края в течение 2002—2004 годов. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. (4) : 30—35.
- Терновой В. А., Протопопова Е. В., Кононова Ю. В., Ольховикова Е. А., Спиридонова Э. А., Акопов Г. Д., Шестопалов А. М., Локтев В. Б. 2007. Выявление случаев лихорадки Западного Нила в Новосибирской области в 2004 году и генотипирование вируса, вызвавшего заболевания. Вестн. РАМН. (1) : 21—26.
- Фоменко Н. В., Сабитова Ю. В., Хаснатдинов М. А., Гольцова Н. А., Данчинова Г. А., Батаа Ж., Амбед Д., Стронин О. В. 2007. Гетерогенность гена р83/100 комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. (4) : 31—37.
- Чунихин С. П., Стефуткина Л. Ф., Королев М. Б., Решетников И. А., Хозинская Г. А. 1983. Половая передача вируса клещевого энцефалита у иксодовых клещей (Ixodidae). Паразитология. 17 (3) : 214—217.

- Alekseev A. N., Dubinina H. V., Jushkova O. V. 2004. First report on the coexistence and compatibility of seven tick-borne pathogens in unfed adult *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina: Ixodidae). *Int. Journ. Med. Microbiol.* 293 (37) : 104–108.
- Burkot T. R., Schneider B. S., Pieniazek N. J., Happ C. M., Rutherford J. S., Slemenda S. B., Hoffmeister E., Maupin G. O., Zeidner N. S. 2000. *Babesia microti* and *Borrelia bisettii* transmission by *Ixodes spinipalpis* ticks among prairie voles, *Microtus ochrogaster*, in Colorado. *Parasitology*. 121 : 595–599.
- Chang C. C., Hayashidani H., Pusterla N., Kasten R. W., Madigan J. E., Chomel B. B. 2002. Investigation of Bartonella infection in ixodid ticks from California. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 25 : 229–236.
- Gritsun T. S., Lashkevich V. A., Gould E. A. 2003a. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 57 : 129–146.
- Gritsun T. S., Frolova T. V., Zhankov A. I., Armesto M., Turner S. L., Frolova M. P., Pogodina V. V., Lashkevich V. A., Gould E. A. 2003b. Characterisation of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *Journ. Virol.* Jan. 25–36.
- Guthrie A. J., Howell P. G., Gardner I. A., Swanepoel R. E., Nurton J. P., Harper C. K., Pardini A., Groenewald D., Visage C. W., Hedges J. F., Balasuriya U. B., Cornel A. J., MacLachlan N. J. 2003. West Nile virus infection of Thoroughbred horses in South Africa (2000–2001). *Equine Vet. Journ.* 35 (6) : 601–605.
- Hilpertshauser H., Deplazes P., Schnyder M., Gern L., Mathis A. 2006. *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in Southern Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (10) : 6503–6507.
- Karbowiak G., Stanko M., Rychlik L., Nowakowski W., Siuda K. 1999. The new data about zoonotic reservoir of *Babesia microti* in small mammals in Poland. *Acta Parasitologica*. 44 : 142–144.
- Kim C. M., Kim J. Y., Yi Y. H., Lee M. J., Cho M. R., Devendra H., Shah D. H., Klein T. A., Kim H. C., Song J. W., Chong S. T., O'Guinn M. L., Lee J. S., Lee I. Y., Park J. H., Chae J. S. 2005. Detection of Bartonella species from ticks, mites and small mammals in Korea. *Journ. Vet. Sci.* 6 (4) : 327–334.
- Korenberg E., Likhacheva T. 2006. Analysis of the long-term dynamics of tick-borne encephalitis (TBE) and ixodid tick-borne borrelioses (ITBB) morbidity in Russia. *Int. Journ. Med. Microbiol.* 296 (S1) : 54–58.
- Lancioti R. S., Ebel G. D., Deubel V., Kerst A. J., Murri S., Meyer R., Bowen M., McKinney N., Morrill W. E., Crabtree M. B., Kramer L. D., Roehrig J. T. 2002. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*. 298 (1) : 96–105.
- Mackenzie J. S., Smith D. W., Hall R. A. 2003. West Nile virus: is there a message for Australia. *The Med. Journ. of Australia*. 178 (1) : 5–6.
- Majlathova V., Majlath I., Derdakova M., Vichova B., Pet'ko B. 2006. *Borrelia lusitaniae* and green lizards (*Lacerta viridis*), Karst Region, Slovakia. *Emerg. Infect. Dis.* 12 : 1895–1901.
- Mediannikov O. Y., Sidelnikov Y., Ivanov L., Mokretsova E., Fournier E. L., Tarasevich I., Raoult D. 2004. Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far East. *Emerg. Infect. Dis.* 10 (5) : 810–817.
- Morales M. A., Barrandeguy M., Fabbri C., Garcia J. B., Vissani A., Trono K., Gutierrez G., Pigretti S., Menchaca H., Garrido N., Taylor N., Fernandez F., Levis S., Enria D. 2006. West Nile virus isolation from equines in Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 12 : 1559–1561.
- Morozova O. V., Cabello F. C., Dobrotvorsky A. K. 2004. Seminested PCR detection of Bartonella henselae in Ixodes persulcatus ticks from Western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 4 : 306–309.
- Peenen P. F. van, Chang S. J., Banknieder A. R., Santana F. J. 1977. Piroplasms from Taiwanese rodents. *Journ. Protozool.* 24 : 310–312.
- Shpynov S., Fournier P. E., Rudakov N. V., Tankibaev M., Tarasevich I. V., Raoult D. 2004. Detection of a Rickettsia closely related to Rickettsia aeschlimannii, «Rickettsia heilongjiangensis», Rickettsia sp. strain RpA4, and Ehrlichia muris in ticks collected in Russia and Kazakhstan. *Journ. Clin. Microbiol.* 42 (5) : 2221–2223.
- Shpynov S., Fournier P. E., Rudakov N. V., Samoilenko I. E., Reshetnikova T. A., Yastrebov V. K., Schaiman M. S., Tarasevich I. V., Raoult D. 2006.

- Short report: molecular identification of a collection of spotted fever group Rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia. *Am. Journ. Trop. Med. Hyg.* 74 (3) : 440–443.
- Smith R. P., Muzaffar S. B., Lavers J., Lacombe J. H., Cahill B. K., Lubelczyk B. K., Kinsler A., Mathers A. J., Rand P. W. 2006. *Borrelia garinii* in seabird ticks (*Ixodes uriae*), Atlantic Coast, North America. *Emerg. Infect. Dis.* 12 : 1909–1912.
- Suss J. 2003. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*. 21(S1) : 19–35.
- Tabara K., Arai S., Kawabuchi T., Itagaki A., Ishihara C., Satoh H., Okabe N., Tsuji M. 2007. Molecular survey of *Babesia microti*, *Ehrlichia* Species and *Candidatus Neoehrlichia micurensis* in wild rodents from Shimane prefecture, Japan. *Microbiol. Immunol.* 51 (4) : 359–367.
- Tsai T. F. 1991. Arboviral infections in the United States. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 5 : 73–102.
- Zamoto A., Tsuji M., Wei Q., Cho S. H., Shin E. H., Kim T. S., Leonova G. N., Hagiwara K., Asakawa M., Kariva H., Takashima I., Ishihara C. 2004. Epidemiologic survey for *Babesia microti* among small wild mammals in Northeastern Eurasia and a geographic diversity in the β -tubulin gene sequences. *Journ. Vet. Med. Sci.* 66 (7) : 785–792.

GENETIC DIVERSITY OF IXODID TICK-BORNE PATHOGENS IN TOMSK CITY AND SUBURBS

E. V. Chausov, V. A. Ternovoi, E. V. Protopopova, S. N. Konovalova,
J. V. Kononova, N. L. Pershikova, N. S. Moskvitina, V. N. Romanenko,
N. V. Ivanova, N. P. Bolshakova, S. S. Moskvitin, I. G. Korobitsin,
S. I. Gashkov, O. J. Titenkov, V. N. Kuranova, L. B. Kravchenko,
N. G. Suchkova, L. P. Agulova, V. B. Loktev

Key words: Ixodidae, ticks, Western Siberia, tick-borne encephalitis virus, West Nile virus, *Borrelia*, *Rickettsia*, *Ehrlichia*.

SUMMARY

We studied two urban and two suburban biotypes of Tomsk City for tick-transmitted diseases prevalence in naturally collected ticks. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) was found in 6.5 % of tick samples, West Nile virus (WNV) in 2.2 %, *Borrelia* spp. in 8 %, *Rickettsia* spp. in 2.5 %, and *Ehrlichia* spp. in 1.7 % of samples. Genetic markers of Powassan virus, *Bartonella* spp., and *Babesia* spp. were not found. Analysis of the genetic diversity of revealed pathogens resulted in the following conclusions: 1. TBEV strains belong to Siberian and Far-Eastern subtypes, and Far-Eastern subtype of TBEV is most frequent in urban biotypes (up to 43 % of urban strains of TBEV); 2. WNV strains belong to genotype Ia; 3. *Borrelia* spp. were classified as *B. garinii*; 4. *Rickettsia* spp. were classified as *R. tarasevic-hiae* and probably as a new *Rickettsia raoultii* subspecies; 5. *Ehrlichia* spp. were classified as *E. muris*. The coexistence of several pathogens was found in 5.7 % of tick samples, and the most frequent combination was TBEV + *Borrelia* spp.